

EFFECTIVIDAD DE LA EVALUACION DE POLEN EN EL CAMPO PARA DETERMINAR ANDROESTERILIDAD EN MAIZ (*Zea mays ssp. mays*)

C. BANCHERO^{1*}, NORA FRAYSSINET^{1*}, SUSANA CARDONE¹, INES FURLAN¹

Recibido: 15/06/96

Aceptado: 23/12/96

RESUMEN

El uso de la androesterilidad citoplásmico-génica para la producción de semilla híbrida de maíz se vio limitado por la susceptibilidad del citoplasma T al patógeno *Bipolaris maydis*.

Una de las fuentes de nuevos citoplasmas que en su interacción con genes nucleares confieran el carácter de androesterilidad puede ser el germoplasma proveniente de los centros de origen.

La evaluación de polen en el campo es una técnica de rutina para el fitomejorador. Sin embargo, en caso de androesterilidad parcial se presentan dudas sobre su confiabilidad. El análisis de la producción de polen en el campo de una planta estéril de la población racial Orgullo Cuarentón (Pcia. de Salta) permitió confrontar los resultados obtenidos por técnicas citológicas con los datos relevados en el campo con el fin de probar fidelidad de estos últimos. La significativa correlación encontrada entre estos dos parámetros ($\tau=0,64$) corrobora la efectividad de la evaluación fenotípica. Para el material estudiado, la observación de la emergencia de anteras, resultó un buen complemento que otorgó mayor confiabilidad a la metodología de campo.

Palabras clave: *Zea mays*, androesterilidad, androesterilidad citoplásmico-génica, mejoramiento de maíz.

RELIABILITY OF POLLEN EVALUATION AT FIELD TO DETERMINE MALE STERILITY IN CORN

SUMMARY

The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production was ban due to the susceptibility of T cytoplasm to *Bipolaris maydis*. Centres of diversity in which can be found the highest level of genetic variability can be a good resource for new cytoplasm that in its interaction with nuclear genes gave male sterility. Pollen production evaluation at field is a routine technic for breeders, however in case of partial sterility the results are not always clear.

The pollen production at field of one sterile plant from the landrace Orgullo Cuarentón (Province of Salta) allows to compare field techniques of pollen evaluation with more sophisticates laboratory techniques. The significant correlation ($\tau = 0.64$) between this two parameters shows the useful of the field technique. Anthers emergency was also a good complement for the male sterility evaluation

Key words: *Zea mays*, cytoplasmic, male sterility, corn breeding

**ex-aequo* Cátedra de Genética, Facultad de Agronomía, UBA. Av. San Martín 4453. 1417 - Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCION

En maíz la hibridación proporcionó material base para la obtención de variedades comerciales y suministró los primeros datos sobre la incidencia de la heterosis en el rendimiento.

En la producción comercial de semilla híbrida de maíz, la técnica más eficiente es el uso de androesterilidad citoplásmico-génica que permite, además de bajar drásticamente el costo de producción por desaparición del despanojado, la obtención de semilla de máxima pureza.

En el caso de no utilizarse esta estrategia, el control de la polinización comprendería la remoción física de la panoja de las plantas que actúan como madre del híbrido. Esta remoción se realiza en forma manual o en combinación con el despanojado mecánico, lo que resulta una operación muy costosa para el productor de semilla. El citoplasma Texas fue el más usado en la producción ya que, comparado con los otros dos empleados (CMS-C y CMS-S), otorgaba androesterilidad máxima a las líneas endocriadas y presentaba poca interacción ambiental, de manera que la restauración de la fertilidad se manejaba fácilmente llegando a sustituir el despanojado manual. La epifitias causada por el patógeno *Bipolaris maydis* signó el ciclo maicero 1969/70 y determinó que este citoplasma se dejara de usar en 1971 (Martínez y Bruni, 1972).

Actualmente, para la producción de híbridos en la Argentina, se utilizan los citoplasmas CMS-C y CMS-S en aproximadamente, un 20% de la producción total; el 80% restante se realiza mediante el despanojado manual o mecánico.

Gini (1939) realizó estudios sobre esterilidad en maíces regionales de la Argentina y describió un caso de androesterilidad citoplásmico-génica en una variedad local de maíz (Amargo Blanco). Dado que ese citoplasma se perdió, es necesaria la búsqueda de nuevos citoplasmas en germoplasma de este centro de origen.

En el proceso de conversión de líneas élite a androestériles y/o a recuperadoras de la esterilidad, el fitomejorador de maíz, evalúa la producción de polen de las plantas segregantes por observación fenotípica de la panoja. De esta manera las

clasifica en las siguientes categorías: estéril, parcialmente estéril y fértil, según los fenotipos descritos por Rogers, *et al.* (1952) y Duvick (1956). Pese a que este método es el más usado y se convirtió en rutinario el criador desconoce, en muchos casos, qué grado de coincidencia existe entre los datos obtenidos en el campo y los resultados de otro tipo de evaluación.

Es común, encontrar panojas en las que se demora la antesis o que ésta es parcial y otras que son aparentemente estériles pero en las que se observan algunas anteras que emergen dejando la duda sobre si producen o no polen. Tracy (1991) utiliza una escala para evaluar fertilidad subdividida en cinco fenotipos que van desde plantas androestériles sin emergencia de anteras hasta fértiles con emergencia total de anteras. Al tratar de evaluar progenies durante el desarrollo del proyecto, "Detección de citoplasmas estériles en razas indígenas de maíz y su posterior transferencia a líneas comerciales" se encontró el mismo problema; por ello se trató de correlacionar la evaluación en el campo experimental con la evaluación en el laboratorio. La observación de granos de polen maduros y teñidos con colorantes diferenciales (Alexander, 1969) permite determinar el porcentaje de granos fértiles ya que estos toman diferente color que los estériles.

El objetivo de este trabajo es la confrontación de los datos de evaluación de polen en el campo con los que surgen del análisis citológico para constatar el valor estimativo de la técnica de campo.

MATERIALES Y METODOS

En la campaña 94-95 se sembraron diez poblaciones raciales de maíces autóctonos con una evaluación preliminar de poca producción de polen en el campo en su lugar de origen (Melchiorre, 1992). Estas fueron cedidas por el Laboratorio de Recursos Genéticos Vegetales "N.I. Vavilov" (FAUBA) y sembradas en el campo experimental de la Facultad de Agronomía (UBA) según un diseño totalmente aleatorizado con dos repeticiones en tres diferentes épocas de siembra. Las poblaciones analizadas en este estudio fueron caracterizadas (Cámara Hernández y Miente Alzogaray, 1979) y responden a los nombres locales de: Pinto 1, Pinto 2, Colorado, Orgullo Cuarentón, Amarillo, Culli 6464, Culli 6470, Pisingallo Púrpura, Chaucha y Negro, con un total de 270 plantas.

También fueron sembradas líneas androestériles e híbridos comerciales para ser utilizados como testigos.

La producción de polen en el campo se evaluó para cada población en el momento de la floración plena mediante ensobrado y observación de la liberación de polen. Otros factores indicativos que se tuvieron en cuenta fueron la morfología de la panoja y la protoginia que permitieron detectar panojas "flacas" o con anteras no emergentes en las cuales la antesis estaba retrasada.

La toma de muestras de las inflorescencias masculinas para el estudio en laboratorio fue realizada en forma sistemática en la espiga de la panoja y en la porción ramificada inferior.

Para el análisis citológico del polen se seleccionaron 5 flores al azar, se extrajo una antera por flor y se efectuó el recuento y la estimación de la viabilidad por la coloración diferencial de Alexander (1969), con tres repeticiones para cada muestra provenientes de principio y plena floración (con un total de 1500 granos).

Morton *et al.*, 1989 hallaron en mutantes androestériles (*ms-7*) alteraciones en la pared del grano de polen cuando se analizó su estructura con MEB. Las micrósporas resultaron de menor tamaño, con la pared adelgazada y con fallas en su estructura. Dado este antecedente se utilizó MEB para observar características morfológicas y anatómicas de los granos de polen.

Para los estudios histológicos se fijaron trozos de panoja en FAA y se deshidrataron según la serie ascendente de alcoholes etílicos. Posteriormente, se infiltraron con Tissuemat (P,F, 56C), se realizaron cortes entre 8 y 10 micrones de espesor con micrótomos rotativo y se colorearon con safranina verde rápido.

En el período agrícola siguiente (95-96) se sembró la progenie del cruzamiento de OC-37 (planta que resultó estéril en el primer año) por una planta hermana y otras progenies derivadas de cruzamientos entre plantas hermanas de la población. De manera que se obtuvieron 500 plantas de la población Orgullo Cuarentón de las cuales 326 fueron evaluadas solamente en el campo, mientras que 46 de este grupo y pertenecientes a la progenie de OC-37, se sometieron al siguiente análisis: se evaluó la producción de polen en el campo por el fenotipo de la panoja, la emergencia de anteras y la viabilidad del polen, clasificándolas en tres categorías (1) estéril, (2) parcialmente estéril y (3) fértil, (aclarando que esta última categoría comprende plantas cuya producción de polen está por debajo de cualquier testigo fértil).

Los dos factores de naturaleza cualitativa como son la producción de polen en el campo y la emergencia de anteras fueron transformados a escalas cuantitativas según el siguiente detalle:

- a) polen en el campo (sin: 15, poco: 30, mayor cantidad: 45).
- b) emergencia de anteras con cuatro niveles (sin: 10, algunas: 20, pocas: 30, todas: 40).

RESULTADOS y DISCUSION

Tres de las diez poblaciones (Amarillo, Chaucha y Orgullo Cuarentón) evidenciaron poca producción de polen en el campo. Una de ellas (OC), presentó una planta sin producción de polen. La misma mostró indehiscencia de las anteras durante todo el ciclo de cultivo; la apariencia de la panoja fue similar a aquella que se encuentra en plantas androestériles. La planta se utilizó para realizar un estudio morfológico, citológico y anatómico comparativo con líneas androestériles y con híbridos comerciales.

Duvick (1965) trabajando con líneas endocriadas demostró que las plantas estériles tenían o no emergencias de anteras dependiendo del citoplasma (USDA o Texas); en nuestro caso aquí estudiado, las anteras de los híbridos eran de mayor tamaño y de aspecto turgente (Fig. 1.a(1)). Las anteras de las plantas con androesterilidad citoplásmico-génica se mostraban arrugadas y pequeñas (Fig. 1.a(2)) mientras que las anteras de la planta en estudio eran de un tamaño y aspecto intermedio entre el de los dos testigos (Fig. 1.a(3)), coincidiendo con la clasificación de Duvick (1956) para la morfología de las anteras con lo observado en un cultivar androestéril de alfalfa por Banchemo *et al* (1970).

Cuando se realizó el corte de las anteras se vio que a diferencia de las plantas con androesterilidad citoplásmico-génica utilizadas como testigo estéril (Fig. 2.a-b), la planta (OC-37) que no produjo polen en el campo tenía, sin embargo, dentro de sus anteras polen formado que nunca fue liberado (Fig. 2.c-d) diferenciándose así del híbrido comercial, utilizado como testigo fértil (Fig. 2.e-f).

Sin embargo, la mayor diferencia se registró en la calidad del polen ya que con la coloración diferencial de Alexander y considerando viables (por tinción) sólo aquellos granos que se presentaban redondos y rojos, se obtuvo un 98% de viabilidad del testigo normal (Fig. 1.b), mientras OC-37 arrojó un resultado del 0% (muestra de 1500 granos) (Fig. 1.c).

Las observaciones con MEB permitieron establecer diferencias morfológicas de los granos de polen de la planta OC37 mostrando granos arruga-

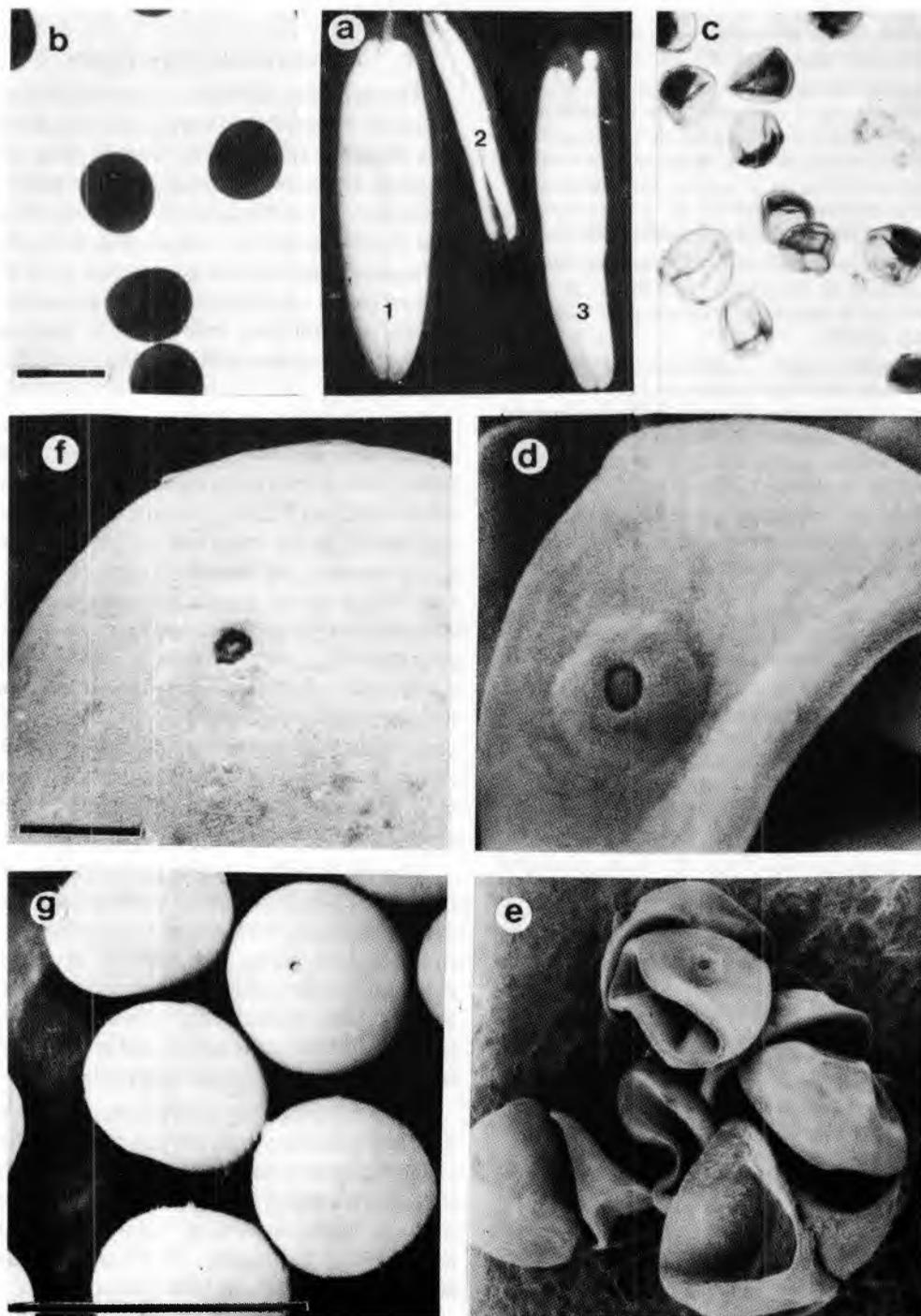


Fig.1:a: Morfología de anteras. (1): testigo fértil, (2): testigo CMS-C, (3): OC37 b-c: Viabilidad de polen según coloración diferencial de Alexander (M.O.). b: Granos viables del testigo fértil. c: Granos inviables de OC-37. (Barra= 10 μ m) d-e-f-g: Granos de polen (M.E.B.). d-c: OC-37. f-g: Testigo fértil.(f: Barra=10 μ m; g: Barra = 0,1 mm).

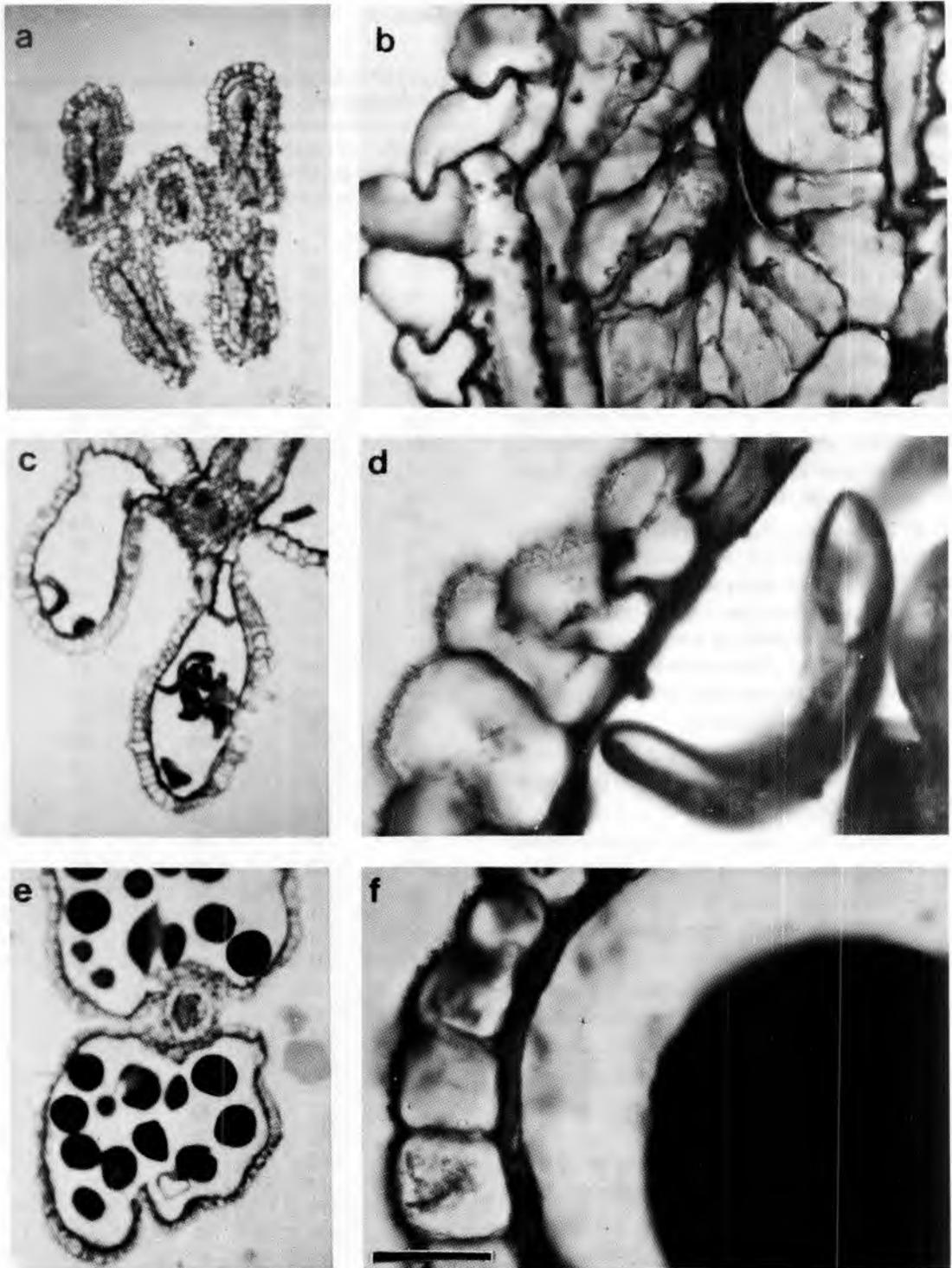


Fig.2: Corte transversal de anteras (M.O). a-b: Testigo estéril CMS-C. - c-d: OC-37. e-f: Testigo fértil. - a-c-e: Barra = 10 µm.

dos y deformes que tendrían correspondencia con aquellos que resultaron inviables según la técnica de Alexander, (Fig. 1. d-e) y que se diferenciaban de los observados para el testigo fértil (Fig. 1. f-g).

En el cuadro No. 1 se muestran los resultados obtenidos para los tres parámetros analizados (evaluación fenotípica en el campo, emergencia de anteras y porcentaje de granos viables) en las 46 plantas descendientes de OC-37.

El análisis del cuadro permite decir que considerando los tres parámetros resulta: el 17% estéril, el 48% parcialmente estéril y el 35% fértil. El 100% de las plantas estériles en el campo dieron porcentajes de viabilidad entre el 7 y el 29 %. El 100% de las mismas tuvieron categorías de 10 y 20 (sin, alguna) de emergencia de anteras.

El 77% de las plantas parcialmente estériles presentaron porcentajes de tinción entre el 30 y 59%. Cuatro de las cinco plantas que se alejaron de este rango mostraron porcentajes mayores. Respecto de la emergencia de anteras, el 59% de la subpoblación parcialmente estéril presentó emergencia de anteras con categoría 30 (pocas) y el 41% restante categoría 40 (todas).

El 81% de las plantas catalogadas fértiles según su evaluación en el campo presentaron porcentajes de viabilidad de 60% y mayor.

El 94% de las plantas fértiles tuvo emergencia total de anteras (categoría 40).

Se hallaron correlaciones altamente significativas entre las 3 variables (se empleó el estadístico no paramétrico τ de Kendall):

*Correlación entre el porcentaje de tinción en laboratorio y la observación de polen en el campo: $\tau = 0,64$ ($p < 0,001$).

*Correlación entre el porcentaje de tinción en laboratorio y la observación de anteras: $\tau = 0,54$ ($P < 0,001$).

*Correlación entre la observación de anteras en el campo y la producción de polen: $\tau = 0,75$ ($p < 0,001$).

En la Fig. 3 se presenta el diagrama de dispersión de los datos respecto a las tres variables. Se

Cuadro N°1: Resultados obtenidos según el método de evaluación utilizado

PLANTA	POLEN CAMPO	EMERG. ANTERAS	TINCION %
29	15	10	9
47	15	10	12
39	15	10	12
15	15	10	20
55	15	20	7
42	15	20	21
61	15	20	29
25	15	20	30
66	30	30	15
34	30	30	30
24	30	30	40
74	30	30	42
27	30	30	43
19	30	30	45
28	30	30	48
44	30	30	48
63	30	30	50
22	30	30	51
21	30	30	57
46	30	30	62
56	30	30	72
71	30	40	30
60	30	40	39
43	30	40	42
23	30	40	44
33	30	40	52
41	30	40	54
48	30	40	57
50	30	40	65
72	30	40	69
62	45	30	65
26	45	40	28
36	45	40	46
64	45	40	51
51	45	40	60
67	45	40	61
52	45	40	63
31	45	40	68
54	45	40	71
32	45	40	71
70	45	40	74
45	45	40	86
49	45	40	90
20	45	40	92
75	45	40	92
59	45	40	95

* Este trabajo fue realizado por el Subsidio UBACyT AG-014

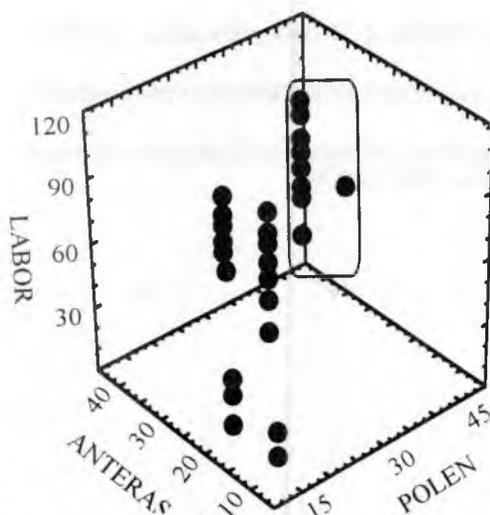


Fig.3. Dispersión tridimensional de los datos

[0,0,0] al punto [40,45,100], lo que ilustra acerca de las correlaciones mencionadas en el párrafo anterior. Se enmarcaron algunos de dichos puntos con fines ilustrativos.

CONCLUSIONES

La evaluación de polen en el campo permitió detectar la planta estéril en la campaña 94-95, condición corroborada luego con técnicas anató-

micas, histológicas y citológicas.

La correlación encontrada entre la evaluación fenotípica (POLEN EN EL CAMPO) y los datos de viabilidad por tinción diferencial (TINCIÓN) hace que el fitomejorador pueda trabajar con datos de campo con un aceptable grado de seguridad sobre todo en la evaluación de la esterilidad parcial, que en general es la que distorsiona las conclusiones al evaluar una progenie. Según se desprende de este análisis, se pueden utilizar con un alto grado de confiabilidad las observaciones de producción de polen en el campo sin tener que recurrir a evaluaciones de laboratorio.

Las plantas con androesterilidad parcial presentaban emergencias de anteras pero con alteraciones en la morfología de las mismas según el porcentaje de polen viable. No obstante, según los resultados obtenidos en nuestro análisis, el complemento de la observación de la emergencia de anteras otorga mayor fidelidad a la evaluación fenotípica en el campo.

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. Agr. Ana D'Ambrogio por su valioso asesoramiento en temas histológicos, a la Ing. Agr. Diana Veliz y al Srta. Araceli García por su colaboración en la toma de datos.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M.P., 1969. Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Technology*, 44 (3).
- BANCHERO, C. B.; R.P. MURPHY and L. V. CROWDER. 1970. Androesterilidad citoplásmica génica en alfalfa (*Medicago sativa*, L.) cultivar Saranac. *Rev. de la Fac. Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires*, 18 (2-3): 103-111.
- CAMARA HERNANDEZ, J. y A. MIANTE ALZOGARAY 1979. Las razas de maíz de la Provincia de Salta. *Resúmenes XVII Jornadas Argentinas de Botánica*. Sta. Rosa.
- DUVICK, D. 1956. Allelism and comparative genetics of fertility restoration of cytoplasmically pollen sterile maize. *Genetics*, 41: 544-565.
- DUVICK, D. 1965. Cytoplasmic pollen sterility in corn. *Adv. Genet.* 13(1 -56).
- GINI, K. 1939. Estudios sobre esterilidad en maíces regionales de la Argentina. *Anales Inst. Fit. Santa Catalina*, 1:135-158.
- MARTINEZ, C. y O. BRUNI. 1972. El tizón del maíz provocado por *Helminthosporium maydis*. I La presencia de raza T en Argentina. EEA INTA. *Informe Técnico* No. 113.
- MELCHIORRE, P. 1992. Phenetic relationships among different races of maize (*Zea mays* ssp. *Mays*) from Salta (Argentina). *Maydica*, 37: 329-338.

- MORTON, C. M.; D. L. LAWSON and P. BEDINGER. 1989. Morphological study of the maize male sterile mutant ms7. *Maydica*, 34: 239-245.
- ROGERS, J. S. and J. R. EDWARSON. 1952. The utilization of cytoplasmic male sterile inbreds in the production of corn hybrids. *Agron. Journ*, 44: 8-13.
- TRACY, W. F; H. L. EVERETT and V.E. GRACEN. 1991. Inheritance, environmental effects, and partial male fertility in C-type CMS in a maize inbred. *The Jour. of Heredity*, 82 (4): 343-346.